

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 2003-088357  
 (43) Date of publication of application : 25.03.2003

(51) Int. CI. C12M 1/32  
 G01N 33/48  
 G01N 35/08

(21) Application number : 2001-343713 (71) Applicant : EFFECTOR CELL INSTITUTE INC  
 (22) Date of filing : 08.11.2001 (72) Inventor : KANEKASAKI SHIRO  
 KIKUCHI YUJI  
 KIKUCHI HIROKO

## (30) Priority

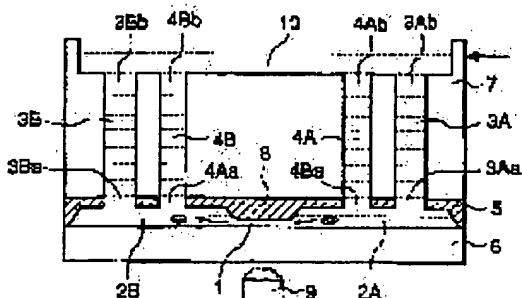
Priority number : 2000372467 Priority date : 07.12.2000 Priority country : JP  
 2001209743 10.07.2001 JP

## (54) DEVICE FOR TREATING SMALL AMOUNT OF SAMPLE

## (57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a structure with which the movement to another well or the overflowing of a sample is prevented when a small amount of sample is injected into a well, the position of the injected sample in the well is adjusted, or the injected sample can be moved to a next well under control.

**SOLUTION:** The small amount of sample treating device having the following structure: a plurality of wells are communicated to each other via parts having resistance to a liquid; each well has a tube for injecting or sucking out a sample, and optionally, a tube for mitigating a pressure change during injection and sucking out; and a plurality of the tubes share a space capable of storing a liquid at their upper ends.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 22.03.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

**BEST AVAILABLE COPY**

[Kind of final disposal of application  
other than the examiner's decision of  
rejection or application converted  
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3738899

[Date of registration] 11.11.2005

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against  
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) ; 1998, 2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-88357

(P2003-88357A)

(43)公開日 平成15年3月25日 (2003.3.25)

(51)Int.Cl'

識別記号

F I

マークー\*(参考)

C 12 M 1/32  
G 01 N 33/48  
35/08C 12 M 1/32  
G 01 N 33/48  
35/082 G 0 4 5  
M 2 G 0 5 8  
A 4 B 0 2 9

## 審査請求 有 試験項の数23 OL (全21頁)

(21)出願番号 特願2001-343713(P2001-343713)  
 (22)出願日 平成13年11月8日(2001.11.8)  
 (31)優先権主張番号 特願2000-372487(P2000-372487)  
 (32)優先日 平成12年12月7日(2000.12.7)  
 (33)優先権主張国 日本 (JP)  
 (31)優先権主張番号 特願2001-209743(P2001-209743)  
 (32)優先日 平成13年7月10日(2001.7.10)  
 (33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 500201406  
 株式会社 エフェクター製造研究所  
 東京都目黒区駒場4-6-2メゾン駒場  
 401号  
 (72)発明者 金ヶ崎 士朗  
 神奈川県川崎市多摩区折形1丁目21-2-  
 503  
 (72)発明者 菊池 佑二  
 茨城県竜ヶ崎市久保台4丁目1-10-2-  
 506  
 (74)代理人 100082739  
 弁理士 成瀬 勝夫 (外1名)

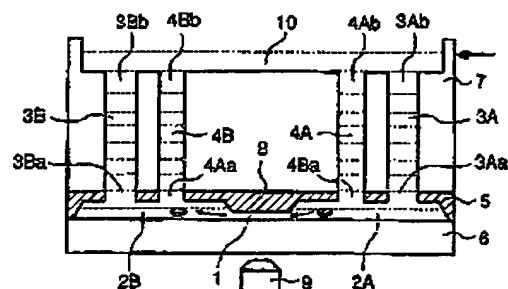
最終頁に続く

## (54)【発明の名称】 微量試料処理装置

## (57)【要約】

【課題】 本発明は、ウエルに微量の試料を注入する際に試料が他のウエルに移動し、或いは溢れ出ることを防止するための構造、及び注入された試料のウエル内における位置を調整し、或いは、次のウエルに制御しながら試料を移動させることができる構造を提供することを目的とする。

【解決手段】 複数のウエルが流体に対して抵抗を有する部分を介して相互に連通しており、且つ矢ヶのウエルが試料を注入・吸出するための管及び、必要に応じ、注入・吸出時の圧力の変化を緩和するための管を備えている場合において、それ等複数の管が上端部において液体を収納できる空間を共有していることを特徴とする微量試料処理装置。



特開2003-88357

(2)

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 様数のウエルが流体に対して抵抗を有する部分を介して相互に連通しており、且つ夫々のウエルが試料を注入・吸出するための管及び、必要に応じ、注入・吸出時の圧力の変化を緩和するための管を備えている構造において、それ等複数の管が上端部において液体を収納できる空間を共有していることを特徴とする微畳試料処理装置。

【請求項2】 流体に対して抵抗を有する部分が、1乃至複数の細いパイプ、狭い間隙、細い溝、フィルター、樹脂カラム、その他流体を通過させ得るが抵抗性を有する構造である請求項1記載の微畳試料処理装置。

【請求項3】 ウエルに設けられた管の上端部が、流体に対して抵抗を有する部分を介して相対する1又は複数のウエルに設けられた管の上端部よりも高く設定されていることを特徴とする請求項1記載の微畳試料処理装置。

【請求項4】 流路を介して互いに連通しているウエルの向かへ一方又は双方において、流路の近傍における液体の量を制限するために、流路に直交して壁を設けることを特徴とする請求項1記載の微畳試料処理装置。

【請求項5】 請求項1乃至4記載の微畳試料処理装置よりなる単位ユニットの1つ、同一又は複数個のユニットを複数個集積させてなる集積ユニット、又は複数の集積ユニットよりなるユニット部及び該ユニット部において液面を調節するためのビベットを備え、且つ、該液面調節ビベットの作動を制御する機構を備えていることを特徴とする微畳試料処理装置。

【請求項6】 液面調節ビベットが、ユニット部の各ユニットの上端部において複数の管により共有されている空間からそこに存在する液体を所定量吸引してウエル内における試料の位置を調整し、或いは、次のウエルに試料を移動させ、必要に応じ該空間に先に吸引した量の液体を供給し液面を元に戻すよう制御されることを特徴とする請求項5記載の微畳試料処理装置。

【請求項7】 試料貯蔵部、換体貯蔵部、及びこれ等各部を移動する試料供給ビベットと換体供給ビベットを備え、且つ、試料供給ビベットと換体供給ビベットの作動を制御する機構を備えることを特徴とする請求項5記載の微畳試料処理装置。

【請求項8】 ビベット洗浄部を備え、ビベットがビベット洗浄部において洗浄液を吸引・排出するよう制御されることを特徴とする請求項7記載の微畳試料処理装置。

【請求項9】 流体に対して抵抗を有する流路を介して複数のウエルが互いに連通していること、各ウエルが試料を注入・採取するための管及び必要に応じ、試料の注入・採取による圧力の変化を緩和するための管を備えていること、それ等複数の管が上端部において液体を収納できる空間を共有していること、及びウエルは管が設け

られている側とは反対の側においてガラス基板と密着していることを特徴とする細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

【請求項10】 細胞を収納するためのウエルに設けられた管の上端部が、流体に対して抵抗を有する流路を介して相対する1又は複数のウエルに設けられた管の上端部よりも高く設定されていることを特徴とする請求項9記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

【請求項11】 流体に対して抵抗を有する流路が、ガラス基板との間で、狭い隙間を形成する土手であることを特徴とする請求項9記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

【請求項12】 流路において、土手の上部にテラスが設けられており、該テラスはガラス基板との間で細胞の径又はその変形能に合わせた隙間を形成することを特徴とする請求項11記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

【請求項13】 流路において、土手の上部に細胞の径又はその変形能に合わせた帽の溝を1乃至複数本構成する隔壁が設けられており、必要に応じ、隔壁と共にテラスが形成されており、該テラスもガラス基板との間で細胞の径又はその変形能に合わせた隙間を形成することを特徴とする請求項11記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

【請求項14】 流路において、相対するウエルに向かう方向の複数本の溝が、これに直交する1乃至複数本の溝で互いに連通していることを特徴とする請求項1記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

【請求項15】 流路において、相対するウエルに向かう方向の複数本の溝の幅が、これに直交する1乃至複数の溝を横切る度に段階的に変化することを特徴とする請求項14記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

【請求項16】 流路において、相対するウエルに向かう方向の複数本の溝の幅が、これに直交する1乃至複数本の溝を横切る度に、相互の位置をシフトさせて形成されていることを特徴とする請求項14又は15記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項17】 流路において、溝を構成する隔壁の列が土手の中央に設けられたテラスを挟んで2箇所に形成されていることを特徴とする請求項13乃至16記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項18】 流路に設けられた土手に、ガラス基板との間で異なる深さの隙間を形成するべく、テラスが多段に形成されていることを特徴とする請求項11記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

【請求項19】 流路において、土手に細胞の径又はその変形能に合わせた幅の溝を1乃至複数本構成する隔壁が設けられており、且つ、土手にテラスが多段に形成されていることを特徴とする請求項11記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

(3)

特開2003-88357

4

3

【請求項20】 流路を介して互いに連通しているウエルの何れか一方又は双方において、流路の近傍における液体の量を制限するために、流路に直交して壁を設けることを特徴とする請求項9記載の細胞走化性検出及び細胞分離装置。

【請求項21】 請求項9乃至20記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置よりなる単位ユニットの1つ、同一又は複数種のユニットを複数個集積させてなる集積ユニット、又は複数の集積ユニットよりなるユニット部、細胞貯蔵部、換体貯蔵部、これ等各部を移動する液面調節ピペット、細胞供給ピペット、換体供給ピペットを備え、且つ、ユニット部における細胞の移動を検出し、必要に応じて検出結果を記録する検出部をユニット部と一体化して設けるか、または、複数のユニット部に対応可能な様に設け、液面調節ピペット、細胞供給ピペット及び換体供給ピペットの移動を制御する機構及び、必要に応じ、ユニット部を検出部に移動させると共に次のユニット部をピペットの動線の位置に移動させるための機構を備えていることを特徴とする自動化された細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

【請求項22】 ピペット洗浄部を備え、ピペットがピペット洗浄部において洗浄液を吸引・排出するよう制御されることを特徴とする請求項21記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

【請求項23】 細胞供給ピペットが細胞貯蔵部から所定量の細胞懸濁液を、必要に応じ攪拌後、吸引して、これをユニット部に供給し、次いで、液面調節ピペットがユニット部の各ユニットにおいて複数の管により共有されている空間からそこに存在する液体を所定量吸引してウエル内の細胞の位置を調整し、次いで液面調節ピペットが該空間に先に吸引した量の液体を供給して液面を元の位置にまで戻し、次いで換体供給ピペットが換体貯蔵部から所定量の液体を吸引し、これをユニット部に供給後、ピペット洗浄部に移動し、洗浄液の吸排を反復繰り返してピペットを洗浄するよう、各ピペットの作動が制御されることを特徴とする請求項22記載の自動化された細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、微畳の液体試料を処理するための装置に関わる。より詳しくは、反応・分析・検出等のために、液体試料を収納するための微小なウエルに試料を注入する際に、試料が溢出し、或いは、連通する他のウエルに移動することを防止すると共に、微小なウエルの内部で試料の位置を調整することができる構造を備えた微畳試料処理装置に関わる。

【0002】更に、本発明は、細胞が一定方向に自力で移動するか否かの判定、細胞が自力で移動する状態の観察、或いは自力で移動した細胞の数を計数するための装置、即ち、細胞走化性検出装置に関わる。また、本発明

は、細胞が選択的に自力で移動することを利用する細胞の分離装置に関わる。より詳しくは、検出・分離等のために、細胞懸濁液又は換体試料を収納するための微小なウエルに試料を注入する際に、試料が溢出し、或いは、連通する他のウエルに移動することを防止すると共に、微小なウエルの内部で試料の位置を調整することができる構造を備えた細胞走化性検出又は走化細胞分離装置に関わる。

##### 【0003】

16 【従来の技術】ナノテクノロジーの発展と展開の下で、細胞、蛋白質、遺伝子等を数個のレベルで取扱うようになり、極微量の試料を、反応・分析或いは検出のために容器(ウエル)に注入し、処理することが必要とされるようになった。反応・分析・検出等をマイクロチップ上で一連の流れとして行わせるために、複数のウエルがパイプや管、或いは流路で互いに連絡している場合がある。このような場合は、試料が注入時の圧力により隣のウエルに移動しないように注意する必要があります。マニュアルで行う場合は勿論、自動注入装置による場合であっても、操作に困難を伴う。更に、微小なウエルに注入された試料の位置を調整し、或いは、次のウエルに、制御しながら試料を移動させることも望まれる。

17 【0004】従来、微量の試料をウエルに注入するためには、コンピュータープログラムによる制御の下でマイクロピペットが使用されてきたが、ウエルを含む反応・分析・検出装置の構造において、微量試料の注入時の問題を解決する試みは、本発明者等による提案以外に知られていない。

18 【0005】即ち、本発明者等は、試料を収納するウエルが、マイクロピペット等により試料を注入し又は吸出するための管を備えている場合において、試料を注入し又は吸出する際のウエル内における圧力の急激な変化を緩和させるために、試料を注入し又は吸出するための管と連通する関係にある管を備えることを先に提案した(特願2000-278280号)。

##### 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、かかる装置において、ウエルに微量の試料を注入する際に試料が他のウエルに移動し、或いは溢れ出ることをより確実に防止するための構造を提供することを目的の一つとし、更には、注入された試料のウエル内における位置を調整し、或いは、次のウエルに制御しながら試料を移動させる構造を提供することを目的とする。また、試料の注入、移動における制御が自動化された微量試料処理装置を提供することを目的とする。

19 【0007】更に、本発明は、上記機能を有する構造を応用した細胞走化性検出又は走化細胞分離装置を提供することを目的とする。

##### 【0008】

20 【課題を解決するための手段】本発明は、複数のウエル

(4)

特開2003-88357

5

が流体に対して抵抗を有する部分を介して相互に連通しており、且つ夫々のウエルが試料を注入・吸出するための管及び、必要に応じ、注入・吸出時の圧力の変化を緩和するための管を備えている構造において、それ等複数の管が上端部において液体を収納できる空間を共有していることを特徴とする微量試料処理装置であり、流体に対して抵抗を有する部分は、1乃至複数の細いパイプ、狭い隙間、細い溝、フィルター、耐指カラム、その他流体を通過させ得るが抵抗性を有する構造から選ぶことができる。

【0009】また、本発明は、ウエルに設けられた管の上端部が、流体に対して抵抗を有する部分を介して相対する1又は複数のウエルに設けられた管の上端部よりも高く設定されていることを特徴とする微量試料処理装置である。

【0010】本発明の微量試料処理装置は、流路を介して互いに連通しているウエルの何れか一方又は双方において、流路の近傍における液体試料の量を制限するために流路に直交して壁が設けられていても良い。

【0011】本発明は、上記微量試料処理装置よりなる単位ユニットの1つ、同一又は複数種のユニットを複数個収容させてなる集積ユニット、又は複数の集積ユニットよりなるユニット部及び該ユニット部において液面を調節するためのピペットを備え、且つ、該液面調節ピペットの作動を制御する機構を備えていることを特徴とする微量試料処理装置であり、更には、液面調節ピペットが、ユニット部の各ユニットの上端部において複数の管により共有されている空間からそこに存在する液体を所定量吸引してウエル内における試料の位置を調整し、或いは、次のウエルに試料を移動させ、必要に応じ該空間に先に吸引した量の液体を供給し液面を元に戻すよう制御されることを特徴とする自動化された微量試料処理装置であり、必要に応じて、試料貯蔵部、検体貯蔵部及びピペット洗浄部並びにこれ等各部を移動する試料供給ピペット及び検体供給ピペット並びにこれ等ピペットの作動を制御する機構を備えることができる。ここで、ピペットの材質は、ガラスに限らず、金属、プラスチック等適宜選んで使用できる。

【0012】本発明は、流体に対して抵抗を有する流路を介して複数のウエルが互いに連通していること、各ウエルが試料を注入・採取するための管及び必要に応じ、試料の注入・採取による圧力の変化を緩和するための管を備えていること、それ等複数の管が上端部において液体を収納できる空間を共有していること、及びウエルは管が設けられている側とは反対の側においてガラス基板と密着していることを特徴とする細胞走化性検出又は走化細胞分離装置を含む。

【0013】本発明は、上記の細胞走化性検出又は細胞分離のための装置において、細胞を収納するためのウエルに設けられた管の上端部が、流体に対して抵抗を有す

10

る流路を介して相対する1又は複数のウエルに設けられた管の上端部よりも高く設定されていることを特徴とする細胞走化性検出又は走化細胞分離装置である。

【0014】更に、本発明の装置は、流体に対して抵抗を有する流路が、ガラス基板との間で、狭い隙間を形成する土手であることが好ましく、この場合において、流路において、土手の上部にテラスが設けられており、該テラスはガラス基板との間で細胞の径又はその变形能に合わせた隙間を形成していてもよい。或いは、流路において、土手の上部に細胞の径又はその变形能に合わせた幅の溝を1乃至複数本構成する障壁が設けられており、必要に応じ、障壁と共にテラスが形成されており、該テラスもガラス基板との間で細胞の径又はその变形能に合わせた隙間を形成していてもよい。流路において、相対するウエルに向かう方向の複数本の溝は、これに直交する1乃至複数本の溝で互いに連通していることができ、更には、流路において、相対するウエルに向かう方向の複数本の溝の幅が、これに直交する1乃至複数本の溝を構くる度に、相互の位置をシフトさせて形成されてもよい。更には、流路において、溝を構成する障壁の列が土手の中央に設けられたテラスを挟んで2箇所に形成されてもよい。また、流路に設けられた土手に、ガラス基板との間で異なる深さの隙間を形成するべく、テラスが多段に形成されてもよい。更には、流路を介して互いに連通しているウエルの何れか一方又は双方において、流路の近傍における液体試料の量を制限するために流路に直交して壁が設けられていてもよい。

【0015】本発明は、上記の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置よりなる単位ユニットの1つ、同一又は複数種のユニットを複数個収容させてなる集積ユニット、又は複数の集積ユニットよりなるユニット部、細胞貯蔵部、検体貯蔵部、これ等各部を移動する液面調節ピペット、細胞供給ピペット、検体供給ピペット及びユニット部における細胞の移動を検出し、必要に応じて検出結果を記録する検出部をユニット部と一体化して設けるか、または、複数のユニット部に対応可能な様に設け、且つ、液面調節ピペット、細胞供給ピペット及び検体供給ピペットの移動を制御する機構及び、必要に応じ、ユニット部を検出部に移動させると共に次のユニット部をピペットの動線の位置に移動させるための機構を備えていふことを特徴とする自動化された細胞走化性検出又は走化細胞分離装置であり、また、必要に応じ、ピペット洗浄部を備えていてもよい。

【0016】更に本発明は、細胞供給ピペットが細胞貯蔵部から所定量の細胞懸濁液を、必要に応じ攪拌後、吸引して、これをユニット部に供給し、次いで、液面調節ピペットがユニット部の各ユニットにおいて複数の管の

50

(5)

特開2003-88357

8

7

上端部により共有されている空間からそこに存在する液体を所定位置吸引してウエル内の細胞の位置を調整し、次いで液面調節ピペットが該空間に先に吸引した量の液体を供給して液面を元の位置にまで戻し、次いで液体供給ピペットが液体貯蔵部から所定位置の液体を吸引し、これをユニット部に供給後、必要に応じ、ピペット洗净部に移動し、洗净液の吸引を反復繰り返してピペットを洗净するよう、各ピペットの作動が制御されることを特徴とする自動化された細胞走化性検出又は走化細胞分離装置である。

【0017】

【発明の実施の形態】本発明において、液体又は懸濁液よりもなる試料が注入されるウエルを備えた微量試料処理装置とは、有機・無機化学物質、タンパク質等の高分子、遺伝子、細胞等を溶液又は懸濁液の状態で取扱う装置である。本発明の構成は、取扱う試料の量に特別の制限はないが、試料の量が数ミリリットル乃至マイクロリットルのオーダー又はそれ以下の場合に、技術的効果が高いことが期待される。

【0018】本発明は、流体の通過に対して抵抗性を有する構造物を介して相互に連通している複数のウエルの夫々が試料を注入し又は吸出するための管を備えおり、必要に応じ、ウエルの夫々が試料を注入し又は吸出する際の圧力の増減を緩和させるための管を備えている場合に適用される。即ち、これらの装置は、全体として複数の管を備えていることになり、本発明は、かかる装置において、設けられている複数の管が上端部において液体を収納できる空間を共有する構造を採用することにより、試料の注入・吸出時におけるウエル内の圧力の急激な変化によって生ずる試料の不測の移動・溢出或いは、装置の水平が崩れた時の試料の不測の移動をより効果的に防止するものである。

【0019】更に、複数の管が上端部において液体を収納できる空間を共有する構造を採用することにより、ウエル内において位置を調整する必要がある試料、又は次のウエルに移動させる必要がある試料を取扱う場合に、微小なウエル内での位置の調節が可能となり、また次のウエルへの移動を制御しながら行うことが可能となる。かかる調節・移動をより的確に行うために、該試料を収納するためのウエルに設けられた管の上端が、他のウエルに設けられた管の上端よりも高く設定される。

【0020】なお、複数のウエルの間で試料の移動を可能とするために、細いパイプ、狭い隙間、細い溝、フィルター、樹脂カラム或いは流路等で相互に連絡しているのが通常である。本発明は、複数のウエルが、かかる液体の通過に対して抵抗性を有する構造物を介して相互に連通している装置に関する。

【0021】本発明を、複数のウエルが流路を介して互いに連通している構造の装置、例えば、細胞走化性検出又は走化細胞分離装置に適用した場合について説明すれ

ば次の通りである。但し、本発明が、細胞走化性検出又は走化細胞分離装置に限られるものではなく、種々な装置に適用可能であることは、以上述べたところから明らかであろう。

【0022】細胞走化性を検出し、或いは細胞を分離するための装置は、ウエルの一つに細胞懸濁液を、他方のウエルに液体溶液を入れ、液体溶液が収容されているウエルに向かって細胞が移動するか否かを検出し、或いは、選択的に移動した細胞を採取する装置である。例えれば、細胞懸濁液を収容するウエルと液体溶液を収容するウエルとが相互に流路でつながっており、流路を細胞が通過する状態を観察し、或いは通過中又は通過した細胞数を計数する装置である。

【0023】流路が、1個ずつの細胞が通過する状況を観察乃至検出できるスケールのものであれば、流体に対して抵抗性を有する。かかる流路を備えた装置においては、試料として用いられる細胞の量が少なくて済み、希少な細胞の検査に優れると共に、定量的検討も可能となるという利点がある。しかし、装置全体が小型になるため、極微量の試料を取扱うことになり、ウエルへの注入によって生じる昇圧の影響が生じやすく、細胞が液体溶液を収容するウエルに向かって不測の移動を起こしやすい。また、注入後においてウエルが完全に水平に維持されていない場合も細胞の移動が起こる。細胞の不測の移動は、液体が走化性因子であるか否かの判定を混乱させる原因となる。よって、細胞が自力で液体溶液を収容するウエルに向かって移動することを正確に検出するためには、試料注入時や注入後における細胞の移動を防止することが必要である。

【0024】そのための対策の一つとして、注入時の昇圧を緩和するために、夫々のウエルに、試料注入のための管以外に、それと連通する関係にある管を設ける構造を、本発明者等が提案した（特願2001-226466号）。その概要を図1及び図2により説明すれば次の通りである。

【0025】図1に示す装置においては、ウエル2Aに、管3Aを通して細胞懸濁液が注入される。ウエル2Bには液体溶液が管3Bを通して注入され、その液体が細胞走化性因子を含む場合は、細胞がウエル2Aからウエル2Bに向かって移動しようとして、流路1を通過する。図1の場合、流路1は、基板5に設けられた土手8と透明なガラス基板6との間で、細胞の大きさに相当する隙間が形成されているが、1個の細胞が通過できる細い溝を複数本構成する隔壁が形成されていても良い。流路1を通過する細胞の状況は、ガラス基板6を通して、例えば顕微鏡9で観察される。図2は基板5の下面図である。

【0026】図1及び図2に示す装置は、各ウエルにおいて管3Aと4A、3Bと4Bが相互に連通した構造であり、連通管を通して圧力を分散させる構造である。これに対し、本発明は、各ウエルに設けられている全ての管

59

(5)

特開2003-88357

9

の上端部が液体を貯容する空間を共有する構造を採用するもので、かかる構造により注入時の移動をより確実に緩和させ、或いは、移動の制御を可能とするものである(図3、図4参照)。

【0027】図3は、本発明に関わる構造の一例を示すもので、基板5、ブロック7及びガラス基板6から構成されるユニットを示している。図3において、10で示す空間が、各ウエルに設けられた管3A、3Bの上端部3Ab、3Bbにより共有される空間であり、装置全体は、細胞走化性に影響を与えない液体、例えば緩衝液等で満たされている。その液体の量は該空間10の少なくとも一部を満たす量である。この液体により、装置全体が同一の圧力下に置かれ、且つ、液体の抵抗により、注入圧及びウエルの水平が崩れた場合による試料の急激な移動が抑制される。

【0028】図4は、本発明に関わる構造の他の例を示すもので、各ウエルが試料注入のための管3A、3B以外に、それと連通する関係にある管4A、4Bを有し、それ等全ての管の上端部3Ab、4Ab、3Bb、4Bbが空間10を共有するユニットの構造を示す。

【0029】なお、移動した細胞を液体貯容ウエルから採取するために、該ウエルに設けられている管から吸引する際に、内部が減圧になりウエル間の試料が相互に入り混じることが起こるが、図4の構造の場合は、特に効果的にその影響が緩和される。

【0030】細胞の走化性を検出し、或いは分離する場合、注入された細胞は、当初、ウエル内において流路の近傍に集められることが望ましい。図3で示す細胞走化性検出又は走化細胞分離装置のユニットを例にとれば、管3Aを通してウエル2Aに注入された細胞は、流路1の近傍に存在することが望ましい。即ち、試料である細胞は、ウエル内での位置を調整することが望まれる試料の例である。この位置の調節は、流路を介して相対するウエル2Bの管3Bから適当量の液体を適当な速度で吸引することにより行うことができる。吸引する液体の量は、空間10の液体を除いた後の、管及びウエルの容積から求められる。吸引する液体の量及び吸引速度はコンピュータープログラムにより容易に制御することができる。

【0031】本発明は、上記構造の変形として、試料、例えば、細胞懸濁液を収納するためのウエルに設けられた管の上端部が、流路を介して相対するウエルに設けられた管の上端部よりも高く設定されている構造を有する微量試料処理装置、例えば、細胞走化性検出装置を含む(図5乃至図7参照)。図5において、管が設けられているブロック7は、ウエル2Bに設けられた管3Bの上端部3Bbの周辺で掘り下げられており、ウエル2Aの管3Aの上端部3Abが管3Bの上端部3Bbよりも高く形成されている。装置全体を満たす液体は、当初は、その液面が、管3Aの上端部3Abより上に来るよう、図中、矢印Iで示される位置に来るよう液槽を調節する。その状態で、管3Aを追じてウ

10

エル2Aに注入された細胞は、装置全体の均一な圧力と液体の抵抗により、急激な移動が抑制され、管3A内及びウエル2A内に散在している。次に、空間10から液体を吸引除去して液面を矢印IIの位置、即ち、管3Aの上端部3Abが露出する位置まで下げ、更に、適量の液体を吸引することにより、管3A内及びウエル2A内に散在していた細胞を、ウエル2A内の流路の近傍に集めることができる。吸引する液槽は、管3A及びウエル2Aの容積に基づき算出でき、通常は、該容積の3分の1乃至10分の1で目的が達せられる。なお、ウエル2Bへの検体溶液の注入も、液面を再び矢印Iの位置に戻した状態で行うことにより、注入時の急激な圧力変化が緩和される。

【0032】液面を再び矢印Iの位置にまで戻す場合に使用する液体として、予め装置内に存在する液体(緩衝液等の水溶液)より比重が軽い液体を用いると、各ウエルの管の上部が軽い液体により蓋がされた形になり、遮断効果により、試料の無用の拡散が防止される。かかる液体としては、試料に対して不活性であり、水に不溶で、比重が1.0未満であれば適宜選択して使用できる。

29 そのような液体の例として、ミネラルオイル(比重0.84/シグマ社製M3516)、流動パラフィン等が挙げられる。

【0033】図6は、各ウエルが試料を注入するための管3A、3Bと共に、これと連通する関係にある管4A、4Bを備えている場合において、ウエル2Aの管の上端部3Ab、4Abがウエル2Bの管の上端部3Bb、4Bbより高く設定されている場合を示す。図7は、ブロック7に斜面を形成させることによりウエル2Aの管の上端部を高く設定した場合を示す。これらは、一方の管の上端部を他方のそれより高く設定する場合の例示であり、同一の目的を達成するために、他にも種々の変形がありうる。

【0034】上記の、一部の管の上端部を他の管の上端部よりも高く設定する構造は、次のようなウエルの連通様式においても効果を発揮する。即ち、流路を介したウエルの連通様式として、図3乃至図7に例示する如き2連式の他に、必要に応じて更に結合させ、連通させることもでき、例えば、図8に例示する3連式が考えられる。図8において、例えば、ウエル2Aに細胞を、ウエル2Bに走化性因子を入れ、ウエル2Cに検体溶液入れることにより、検体溶液が走化性因子の阻害作用を有するか否かを調べることができる。多連式にすれば、その他にも、種々の目的に応用することができる。

【0035】図9に例示するように、一つのウエルの周りに流路を介して複数のウエルを連通させた、所謂、同心状の形式をとることもできる。更には、図9のタイプの変形として、図11の如く、同心円状にすることもできる。図11は、3連式を同心円状にした例であるが、2連式でも良い。図9の場合、貫通孔3Aaに管3Aが設けられており、貫通孔3B<sub>1</sub>~<sub>3</sub>aには管3B<sub>1</sub>~<sub>3</sub>が、貫通孔4B<sub>1</sub>~<sub>3</sub>aには管4B<sub>1</sub>~<sub>3</sub>が矢印で設けられる。ウエル2Aに管3Aを通して細胞浮遊液を入れ、ウエル2B<sub>1</sub>~<sub>3</sub>に

(7)

特開2003-88357

11

種々の検体を入れることにより、複数の走化性因子の検索を同時に実行することができる。更に、複数種の細胞を含む試料をウエル2Aに入れることにより、細胞を種類別に分離することを一度に行うことができる(ソーティング)。例えば、ウエル2B<sub>1~n</sub>に細胞の種類に対応した走化性因子を入れ、中央のウエル2Aに複数種の細胞を含む試料、例えば、全血を入れる。試料に含まれる細胞は、夫々の細胞走化性因子が存在する各ウエル2B<sub>1~n</sub>に向かって移動する。一定時間経過後に各ウエル2B<sub>1~n</sub>から、管3B<sub>1~n</sub>を通じて細胞を採取し、或いは、各ウエル2B<sub>1~n</sub>に移動した細胞を同定する。

【0036】図8、9、11に示されるようなウエルの追通模式において、管3及び4はそれ等が存在するウエル2において互いに追通している。これ等の連通模式において、総ての管の上端部が一つの空間10を共有しており、細胞が注入されるウエルの管の上端部を他のウエルの管の上端部より高く設定し、空間10に、細胞が注入されるウエルの管の上端部が覆われる高さになるように、液体を入れる(図10参照)。図10は、図9に示す装置の一点破線における断面図であり、ウエル2Aの管3A、4Aの上端部3Ab、4Abが、他のウエル2B<sub>1~n</sub>の管3B<sub>1~n</sub>の上端部3B<sub>1~n</sub>bよりも高くなるように設定されている。矢印Iは、空間10を満たす液体の液面の位置が管3A、4Aの上端部3Ab、4Abより上にあることを示す。管3Aを通してウエル2Aに注入された細胞は、管3A及びウエル2A内に散在しているが、空間10の液体を吸引除去して、液面を管3Aの上端部3Abが露出する、矢印IIの位置まで下げる後、更に適度を吸引することにより、ウエル2A内において細胞をウエル2B<sub>1~n</sub>の方向に向かって移動させ、各ウエルに向かう流路1の近傍に集めることができる。吸引する液量は、管3A及びウエル2Aの容積から算出できる。かくして、ウエル2A内の細胞は、ウエル2B<sub>1~n</sub>に対して、位置的に同一の条件で走化性の有無を調べることが可能となる。

【0037】本発明の構造を適用することができる、他の場面として、例えば、図21に示す如き装置が考えられる。即ち、図21は、ウエル2Aで反応を行わせ、次いでカラム16を通して処理を行い、吸着されずに通過したものとウエル2Bから採取する装置の概念図である。この場合、カラムが液体に対し選択性を有する障壁を形成している。液面が矢印Iの状態で、ウエル2Aに反応させる物質を入れ、反応終了後、液面を矢印IIまで下げる。更に吸引することによりウエル2Aの反応混合物はカラム16に移動する。更に吸引することにより、カラムを通過した物質がウエル2Bに移動する。なお、カラムに吸着した物質が目的物である場合は、ウエル2Aを経由して溶出液をカラムに供給し、溶出物をウエル2Bに集めることができる。

【0038】上記以外にも種々の応用が可能であり、互いに追通したウエルの間における試料の移動を制御する

12

ことで、物質間の相互作用を微量のレベルで調べることができます。例えば、抗原抗体反応、酵素と基質との反応、可溶性受容体とリガンド等種々の反応に用いることができる。

【0039】例えば、図5の装置のウエル2Aにおいて、一定の大きさのプラスチックビーズを結合させた抗体と抗原蛋白混合物とを反応させた後、空間10の液面をIからIIに下げ、更に液体を吸引することにより、未反応の抗原蛋白は隔壁12の溝を通過してウエル2Bに移動する。

16 しかし、プラスチックビーズが結合した抗体と反応した抗原蛋白は、ビーズのために隔壁12の溝を通過することができず、未反応の抗原蛋白と分離される。かくして、ビーズの粒径と溝の幅を適当に組合わせることにより、物質を分離することができる。

【0040】更に、磁気ビーズを利用することもできる。即ち、可磁化物質(例えば、 $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ と $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )を均一に分布させた高分子ポリマーのコアを親水性ポリマーで覆った、粒子径が均一な磁気ビーズ(magnetic beads)が市販されており(DYNAL社、ノルウェー/商品名 Dynabeads)。この表面に種々の抗体を結合させることにより、磁気ビーズを細胞やタンパク質に結合させることができ。磁気ビーズは強力磁石(MPC)を近づけると磁化されて磁力を引き寄せられ、磁石を離すと磁性を失って元通り分散するという性質を有しており、それをを利用して細胞やタンパク質の精製等に利用されている。例えば、Kanematsu, S. et al., J.Biochem. 117:758-765(1995)においては、CM抗体でコートされた磁気ポリスチレンビーズ(DYNAL社)を用いて末梢血Bリンパ球を単離している。

30 【0041】図22に例示するような装置において、液面がIの状態でウエル2Aに蛋白質の混合液と磁気ビーズでラベルされた抗体(磁気抗体ビーズ)を注入し、ウエル2Aの底部に設置したマグネット24で、抗体と反応した蛋白質を吸着した後、液面をIIまで下げ、更に空間10から液体を吸引すると、マグネット24で吸着されない蛋白質のみがウエル2Bに移動する。かくして、抗体を適当に選ぶことにより、所望の蛋白質を分離し、或いは、不必要な蛋白質を除去することができる。従来、磁性体を用いる蛋白質の分離は、カラムを用いて行われてきたが、処理装置がミリリッターのスケールであり、微量の蛋白質を処理するには向きであった。本発明の装置によれば、数マイクロリッター又はそれ以下のスケールでも、蛋白質の分離を行うことができる。

40 【0042】本発明によれば、かかる装置の全体を小型化することが可能であり、試料の処理を微細で行うことでき、しかも各ユニットを多数集積させて、多数検体の処理を同時に実行することが可能となる。更に、液体の吸引・注入のプログラム制御により自動化して行うことが容易である。

50 【0043】即ち、装置の自動化は、上記微量試料処理

(8)

特開2003-88357

13

装置のユニット単体、同一又は複数種のユニットを複数個集積させてなる集積ユニット、或いは複数の集積ユニットよりなるユニット部及び液面調節ビペットと液面調節ビペットの作動を制御する機構を備えることにより達成することができる。液面調節ビペットの作動は、液面調節ビペットが、ユニット部の各ユニットの上端部において複数の管により共有されている空間からそこに存在する液体を所定量吸引してウエル内における試料の位置を調整し、或いは、次のウエルに試料を移動させ、必要に応じ該空間に先に吸引した置の液体を供給し液面を元に戻すよう制御される。この制御は、コンピュータープログラムにより容易に行われる。

【0044】なお、ユニット部と共に試料貯蔵部、検体貯蔵部、及びこれ等各部を移動する試料供給ビペットと検体供給ビペットを備え、且つ、これ等ビペットの作動を制御する機構を備えることにより、試料・検体・試薬等の供給・採取も含めた装置全体を自動制御することができる。更に、必要に応じて、ビペット洗浄部及びビペット洗浄部におけるビペットの洗浄操作を制御する機構を付加することもできる。

【0045】本発明に関わる装置の構造を、細胞走化性検出装置を例にして更に具体的に説明すれば次の通りである。但し本発明は、細胞走化性検出装置に限られるものではなく、他の装置においても同様な技術的問題点を解決するために採用し得ることは上述した通りである。

#### 【0046】1) ユニットの構造

図3に示すように、流路1及びウエル2A、2Bは基板5上に一体的に構築され、基板5には各ウエルに通じる管3A、3Bと連絡する穴（貫通孔）3Aa、3Baが設けられる。管3A、3Bを穿ったプロック7が、各管が基板5上の各貫通孔3Aa、3Baに合致するように固定される。プロック7の上部には管3A、3Bの上端部3Ab、3Bbにより共有される空間10が設けられる。基板5の下面には光学研磨したガラス基板6を密着させる。なお、プロック7、基板5及びガラス基板6はO-リングやパッキング等を介して締め付けることにより圧着・固定してもよい（図20参照）。或いは、基板5とガラス基板6とが一体化した構造を形成していてもよく、更には、基板5、ガラス基板6及びプロック7とが一体化した構造を形成していてもよい。なお、ウエル2A、2Bに設けられる管は図4に示すように、試料の注入・採取のための管3A、3B等と共に圧力の変化を緩和するための管4A、4B等を備えていても良い。また、空間10は、図5、図6等に示すように一部が深く掘り窪められていてもよく、或いは、図7外に示すように斜めに高低差がつけられていても良い。

#### 【0047】2) ウエル

ウエル2は、試料、即ち、細胞浮遊液又は走化性因子含有液、同阻害剤含有液等の検体溶液を収納するもので、容積は、特に制限は無く、必要最小限の液量を収納

14

できればよい。例えば、深さ0.05~0.1mm程度、幅1.2mm程度、長さ2.5mm程度あれば充分である。なお、流路を介して互いに連通しているウエルの何れか一方、例えば細胞を収納するウエル、又は双方において、流路の近傍における液体又は細胞懸濁液の量を制限するべく、流路に直交して壁を設けることにより、ウエル内における細胞の位置を調整してもよい（図24）。図24は、流路1を介してウエル2A、2Bが連通しており、夫々のウエルに、流路1に直交して壁24A及び24Bが設けられている場合を示す。壁24と流路1との間隔は任意に設定できるが、通常は50~300μmから選ばれる。

【0048】図25は、流路に直交して壁を設けたウエルと流路の変形例を示しており、（1）はウエルの帽の一部に流路が設けられている場合を、（2）は流路が中央で二分され、流路を挟んで二個のウエル（2A）に対し二個のウエル（2B、2C）が設けられていると共にウエル2A側のみ壁24が設けられている場合を、（3）は流路において隔壁の列がテラス11を挟んで二列設けられている場合を、夫々示している。このような変形は例示として挙げたもので、これ等に限られないことは云うまでもない。また、必要に応じ、流路に直交して設けた壁と土手の間をテラスにしてもよい。

#### 【0049】3) 流路

流路1（図1、図3、図4参照）の構造の一例を図12により説明すれば次の通りである。流路1は、両端のウエル2Aとウエル2Bを隔てる土手8（基板5上の突出部）及びガラス基板6により構成される。土手8は、流路1の両端にあるウエル2A、2Bを隔てるもので、土手8のサイズは、特に限定されるものではないが、例えば、高さ0.003~0.1mm程度、相対するウエルに向かう方向における長さとして0.01~0.5mm程度、相対するウエルに向かう方向に直交する方向における長さとして1.2mm程度あればよい。

【0050】好みの様としては、土手の上に、図13～図15に示されるような複数の隔壁12が設けられ、細胞が通過する溝1が形成される。土手の上部に溝を構成する隔壁を設けない場合は、土手の上面がガラス基板との間で細胞の径又は細胞の变形能に合わせた深さ乃至隙間であるテラスを形成する。この場合の深さは、細胞の種類に合わせて、通常3~50μmから選ばれる。好中球、好酸球、好塩基球、单球・マクロファージ、T細胞、B細胞等の場合3~10μm、例えば4、5、8又は10μmから選ばれ、がん細胞や組織に存在する細胞の場合は8~20μmの帽が選ばれる。

【0051】土手の上面に、隔壁を挟んで、平面であるテラスを設けると細胞の通過が観察しやすくなる。テラス11（図12）は、必須なものではないが、設けることが好みの様。テラス11を設ける場合、その相対するウエルに向かう方向の長さは約0.01mm乃至約0.5mmから適宜選ばれる。

(9)

特開2003-88357

15

【0052】なお、図23に例示するように、テラス11を多段式に形成することにより、ウエル内で細胞等の試料の位置を調整するために、一方のウエル側から吸引すると、他方に入れた試料が土手8の近傍に集まり易くなる。例えば、試料が好中球、好酸球、好塩基球等である場合、テラス11<sub>1</sub>、及び11<sub>2</sub>のガラス基板6からの距離(図においては隔壁12の高さ)を3μm、テラス11<sub>1</sub>及び11<sub>2</sub>のガラス基板6からの距離を4.5μmとし、ウエル2Aに細胞を入れ、ウエル2B側から吸引すると、これらの細胞はテラス11<sub>1</sub>で一度止まった後、テラス11<sub>2</sub>とガラス基板6との間に集まり易くなる。各テラス11<sub>1</sub>及び11<sub>2</sub>のガラス基板6からの距離は、取扱う試料に応じて適宜設定することができ、鍛ね乃至5μmの範囲で設定され得るが、これに限定されるわけではない。ここで、細胞を収納するウエルの反対側のテラス(11<sub>1</sub>)の長さを、細胞を収納するウエルの側のテラス(テラス11<sub>2</sub>)より約1.5乃至5倍長くすると、溝を通り抜けた細胞の観察や計数をより容易に行なうことができる。なお、図23は隔壁12が設けられている場合を示しているが、テラス11<sub>1</sub>及び11<sub>2</sub>のガラス基板6からの距離が細胞の径又は変形能に相当する場合は、隔壁は必ずしも必要ではない。

【0053】土手の上面に隔壁12(図12~14参照)を設ける場合、隔壁12により構成される溝13の断面は、V字型断面、凹型断面、半円型断面等、任意の形状とすることができる。溝13の幅は、細胞の径又はその変形能に合わせた幅であることが好ましい。ここに、細胞の変形能とは、細胞が彈力性を有するものであるとき、その弾力性のために容易に形を変え、扁平状やひも状などの形態をとり、通常、細胞が自由空間でとる形状(球状)において有する径よりも狭い間隔の溝を通り抜けることを言う。かかる溝を設けることにより、細胞を個々のレベルで観察することが可能となり、又、細胞を所望の種類ごとに分離することができる。溝13の幅は通常3~50μmから選ばれ、対象とする細胞が1個づつ通過するだけの幅であることが好ましく、細胞の種類に合わせて好適な幅が選ばれる。好中球、好酸球、好塩基球、単球・マクロファージ、T細胞、B細胞等の場合は3~10μm、例えば3、5、8又は10μmから選ばれ、がん細胞や組織に存在する細胞の場合は8~20μmの幅が選ばれる。溝5の数は、流路の幅に対する隔壁の幅と溝の幅で決定される。例えば、流路の幅1mm、隔壁の幅10μm、溝の幅5μmの場合、溝の数は最大で66本となる。検出・観察に適した溝5の数は、1乃至約100本、好ましくは好ましくは約10乃至約70本である。

【0054】隔壁12の長さは、約5~約400μmから選ばれ、例えば、5、15、20、30、40、50、100、200、300又は400μmのものが用いられる。隔壁12自体の幅は適宜選ぶことができる。また、後述する図38の場合は、縦横の長さがほぼ等しい方が効率的である。

16

【0055】溝路1を形成する溝13は、図15Cに例示するごとく、相対するウエルに向かう方向に直交する1乃至複数本の溝14で互いに連通していてよい。かくすることにより、一方のウエルに入れた物質が他方のウエルに向かって拡散するのを均一化させ、或いは、細胞が通過する様子をより正確に把握することができる。その場合、溝13の幅を、相対するウエルに向かう方向でこれに直交する溝14を備切る度に段階的に変化させてもよい(図36、図37参照)。或いは、溝路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する溝を備切ることに相互の位置関係を変えてよい(図38参照)。図38では、2分の1ピッチ、直行する方向にシフトしている場合を示す。更には、隔壁が相対するウエルに向かう方向に整がっていてよい(図39参照)。また、土手の中央にテラスを設け、テラスをはさんで、隔壁の列を2箇所に形成することもできき(図25(3)、図40参照)、かかる構造とすることにより、溝を通過した後の細胞の観察・計数が容易に行われる。なお、中央のテラスの大きさは、顕微鏡の視野でカバーできる大きさであることが望ましい。図40において、(1)は上面図、(2)は断面図である。

【0056】隔壁12の高さ(溝の深さ)は、細胞の移動を観察する際の顕微鏡やCCDカメラ等の対物レンズの焦点深度内に収まる深さであると便利であり、例えば、10~40倍の対物レンズの焦点深度に合わせると3~4.5μm程度が好ましいが、これに限定される必要はない。

【0057】4) ウエルと溝路の作製  
基板5の材質としては、微細加工が容易で、細胞に対し比較的不活性なシリコン単結晶が好ましい。溝路1の隔壁12及び溝13は、このシリコン単結晶に集積回路の製作で使用されるフォトリソグラフィやエッティング、例えばウエットエッティングやドライエッティング等により工作される。ウエル2及び貫通孔3a~4aは隔壁12や溝13に比べれば比較的大きいので様々な既知の工作技術を適用して作製することができる。例えば、サンドトラスト法やドライエッティング法を適用することができる。シリコン単結晶以外にも、硬質ガラス、硬質プラスチック、金属等も溝路における微細な構造が構築可能であれば使用できる。プラスチックを使用する場合は、表面に親水性を付与するための処理、例えば、表面に親水性薄膜を形成させる処理を行なうことが好ましい。なお、溝路1とウエル2を夫々別に作製し、組合せてもよい。

【0058】5) ブロック及び管  
ブロック7は図3に例示するように、基板5上にあってウエルに通じる管を有する部分である。管の断面は、通常は四角形又は円形から選ばれる。管の太さは、特に限定されるものではないが、四角形の場合は1辺が1mm程度でよく、円形の場合は直径が1mm程度でよい。長さは、細胞浮遊液、検体溶液の容置を保持する上から、2mm~10mm程度は必要である。ブロック又は管を構成する材質は、ガラス、アクリル等のプラスチックス

(10)

特開2003-88357

17

又は金属から選ぶことができ、管は、通常の工作手段、例えば、ドリルやレーザー光線による露孔その他により容易に作製される。ブロック7に、管の上端部により共有される空間を設けることも通常の工作技術により行うことができる。

【0059】各ユニットに手作業(マニュアル)で、細胞又は検体を注入する場合のために、夫々の注入管の上端部の周りを、注入管の径よりも大きくロート状に掘り窪めておくと、ビベットの挿入が容易となる(図35(1)、(2)における29)。

【0060】6) ガラス基板

ガラス基板6は、図3に例示するように、基板間に圧着して液体を収納する空間を構成し、且つ流路を通過する細胞の観察を可能とするもので、光学的に透明且つ平面性を保持し、細胞が接着する面を提供するものである。かかる目的に適うものであれば、ガラス以外にも、透明アクリル等のプラスチックも使用できる。厚さは、基板に圧着させる際にゆがみが生じない限り特に限定されるものではないが、0.7~2mmあれば充分である。

【0061】7) 多数のユニットの配列

流路を介して連通した複数のウエルを1ユニットとして、複数のユニットを1枚の基板上に配置乃至集積して多種検体を同時に処理する装置とすることができます。同じタイプのユニットを並列に配置し、又は、異種のユニットを並列することが可能である。以下に各図に基づいて配置乃至集積の様式を説明するが、もとよりこれ等は例示であり、これ等に限定されるものではなく、目的に応じて種々の組み合わせを探ることができる。

【0062】図16は、図4に示す、2つのウエルが流路を介して連通してなるユニットが、1辺が15mmの正方形である一枚の基板5上に12個設けられた例を示す。この例では、1ユニットの大きさは長辺が5.7mm、短辺が1.2mmであり、各ユニットは0.8mmの間隔で配置されている。

【0063】図17は、図15に示される多数ユニットの集積更に集積させた場合の一例を示す。即ち、図17においてA、B、Cで表される四辺形のうちが図16で示される集積である。ここで、A行、B行及びC行は互いに異なるタイプのユニットの集積であることができる。

【0064】図18は、2連式の独立したユニットが円形に集積されている例を示す。図18の一点破線において断面を図19に示す。大きさの一例を示せば、ウエル2A及び2Bは半径方向の幅が1.5mm、流路1の半径方向の幅は0.5mmであり、流路1には10μm幅の溝13が設けられている。この場合、ユニット全体としての円の半径は5.0mmとなる。

【0065】図26は、図24に示すタイプのユニットが12個集積配置された場合を示す。

【0066】これら、多数のユニットを集積させる場合

18

において、ブロック7又ガラス基板6は、ユニット全体をカバーするように1個又は2枚とすることができる(図20参照)。

【0067】図20は、多数ユニットを集積させた細胞走化性検出及び細胞分離装置を組立てる場合の一例を示す。カバーキャップ17と中間支持体21の間に多数ユニットを集積させた基板5、パッキング5'とそれをカバーする1個のブロック7をおき、中間支持体21と底支持体22の間に1枚のガラス基板6をおき、ネジで締め付ける。

19 ブロック7と基板5との位置関係は中間支持体21で規定され、中間支持体21に設けられたガイドピン20とブロック7の底面に設けられたガイドピン受孔19によって固定される。なお、基板5とブロック7とは直接圧着させても良い。

【0068】なお、図20において、集積ユニットの代わりに、1つのユニット、即ち、1対のウエルと流路を設けた基板5を用い、全体を組み立てたユニットを、一定の間隔で複数個配置することも可能である。この場合、ユニット毎に逐次交換することができる。

20 【0069】8) 自動制御機器

本発明の微装置試料処理装置の自動制御機器を、細胞走化性検出装置を例にして具体的に説明すれば次の通りである。なお、これは例示であり、自動化という目的を達成するために、種々の機能を採用し得ることは云うまでもない。

【0070】本発明に関わる細胞走化性検出装置の自動制御機器の例を図27に示す。図27において、Uはユニット部、Cは細胞貯蔵部、Sは検体貯蔵部、Wはビベット洗浄部を示す。直線X-X'は、横列に配置された複数個(図では5個)の検体供給ビベットの動線の例を示し、直線Y-Y'は、縦列に配置された複数個の細胞供給ビベットの動線の例を示す。ユニット部Uはビベットの動線位置にセットされており、各ユニットの上端部の空間には液体が蓄たされている。細胞貯蔵部Cには、細胞が収納されており、検体貯蔵部Sには各種の検体が収納されている。縦列に配置された複数個の液面調節ビベットはユニット部Uの4B~4A上にセットされており、その動線は、例えば図28のZ-Z'で示される。各ビベットの動きの一例を説明すれば以下の如きであるが、これに限られないことは云うまでもない。

【0071】細胞供給ビベットが細胞貯蔵部Cから所定量の細胞懸濁液を吸引し、動線Y-Y'上をユニット部Uまで移動し、各ユニットのウエル2Aに細胞注入管3Aを通して細胞懸濁液を供給する。その後、細胞供給ビベットはCの位置に戻り、作動を停止するか、後続のユニットに細胞懸濁液を供給するために移動する。なお、細胞は重力下で沈殿するので、細胞供給ビベットの排出吸入動作を利用して、細胞を吸引採取する直前に、細胞貯蔵器29内の細胞懸濁液を攪拌することが好ましい。

【0072】次いで、図28に示す如く、液面調節ビベッ

(11)

特開2003-88357

19

トが各ユニットの空間部10の液体を吸引し、液面をIIの位置まで下げた後、更に所定量を吸引してウェル2A内の細胞の位置を調整する。その後、液面調節ピペットは液面Iの位置又はそれより高い位置まで上昇後、動線2-Z'上の何れかの位置で先に吸引した量の液体を排出し、空間10の液面をIの位置に戻す。その後、液面調節ピペットは更に上昇し、作動を停止するか、後続のユニット上に移動する。

【0073】次に、換体供給ピペットが換体貯蔵部Sから所定量の換体を吸引し、動線X-X'上をユニット部Uまで移動し、換体注入管3Bを通してウェル2Bに換体を供給する。その後、換体供給ピペットは動線X-X'上をピペット洗浄部Wまで移動し、洗浄槽の洗浄液を反復吸引してピペットを洗浄する。その後、ピペットは洗浄槽の液面上まで上昇し、作動を停止するか、後続のユニット部Uに換体を供給するために移動する。

【0074】かくして細胞懸濁液及び換体が供給されたユニット部Uは図27の矢印⇒の方向に移動し、流路1が換出部に合致する位置で停止し、細胞の状態が検出・記録される。ユニット部Uの移動により、次のユニット部Uの列がピペットの動線位置にまで移動し、上記の一連の作動が繰り返される。なお、ユニット部Uを換体貯蔵部Sと一緒に移動させることもでき、その場合は、ユニット部U及び換体貯蔵部Sの移動により、次のユニット部U及び換体貯蔵部Sの列がピペットの動線位置にまで移動することになる。

【0075】細胞貯蔵部Cは、ユニット部Uに供給される細胞を一時的に貯容するための容器を備えており、その機能を有すれば、容器は如何なる形状でも良い。図29は、細胞貯蔵部Cの形体の一例を示すもので、ユニット部Uにおける各ユニットの配置及び複数の細胞供給ピペットに対応して複数の細胞貯蔵容器25が配置されている。図29には、各容器への細胞の注入を容易にし、細胞を無駆なく使用するために注入部26が斜面の形で設けられている場合が示されている。更に、各容器には細胞懸濁液瓶が無駆なく、且つ、容器内に入り易くするための導入部27を設けることが好ましい。このような構造を採用することにより、細胞懸濁液を細胞貯蔵部の任意の箇所で注入すれば、全ての容器に細胞懸濁液が供給されるため、夫々の容器に注入する手間を省くことができる。なお、細胞懸濁液が無駆なくピペットに吸引されるために、細胞貯蔵容器25の底部を絞ることが好ましい。図29において、(1)は斜視図、(2)は上面図、(3)は図(2)の破線A-A'における断面図であり、(4)は図(2)の破線B-B'における断面図である。

【0076】換体貯蔵部Sは、ユニット部Uに供給される換体を一時的に貯容するための容器を備えており、その機能を有すれば、容器は如何なる形状でも良い。多種類の換体がユニット部Uに供給される場合は、各換体をマイクロピペット等を用いた手作業により換体貯蔵部S

20

の容器に注入することが多いが、その場合、手作業による注入を容易にするために、図30に例示するように、容器の口径よりも大きな径を有するピペット先端部の導入口29を設けることが好ましい。また、容器から換体試料を取り出した際、残留する量を少なくするために、図30に例示するように、容器の底部を細く絞ることが望ましい。図30において、(1)は斜視図、(2)は断面図、(3)は上面図である。なお、図(2)には、マルチアル操作により換体を注入する際に、ピペットの先端部34がピペット先端部の導入口29から容器28の内部にまで挿入されている状態を示してある。図31には、複数個の換体貯蔵容器が、換体供給ピペットの動線X-X'に沿って配列された場合を示す。図の如く、注入口が交互に反対側になる様に配置すれば、容器の間隔をユニット部Uにおけるユニットの間に合わせることができる。なお、換体貯蔵容器は角型であってもよく、その例を図32に示し、図33には複数個の換体貯蔵容器が、換体供給ピペットの動線X-X'に沿って配列された場合を示す。

【0077】本発明の装置において使用されるピペットは、その移動及び液体の吸引・排出をコンピューターで制御できるもので、図34に例示するような、マルチチャネルシリンジを有するタイプのものが好ましい。ピペットのニードル(先端部)は、ガラス、金属、プラスチック等から作られる。図34において(1)は上面図、(2)は端面図である。

【0078】本発明において用いられる検出手段は、流路を移動する細胞又は移動した後の細胞を検出できる手段であればよく、必要に応じ検出結果を記録するための手段を含む。細胞を検出・記録するため知られている手段であれば何れも使用可能であり、例えば、頭微鏡、頭微鏡とビデオカメラの組合せ等である。対物レンズにCCDカメラを取り付けた構造を採用することもできる。集積ユニットの検出においては、対物レンズが各ユニットの流路を順次スキャンする構造を採用することが好ましい。

【0079】検出手段は、通常は、図4に示すように、ユニットの流路に設定されるが、多数ユニットを集積させた自動装置においては、所定の位置に設置された検出手部に各ユニットの列が順次移動し、検出・記録を行う構造を採ることもできる。検出は、直線上に並んでいる各ユニットの流路を検出器がスキャンすることにより行われる。スキャンする検出器は1個でも良いし、複数個でもよい。かくすることにより、比較的少ない数の検出装置で多数の集積ユニットに対応することが可能となる。

【0080】流路上を通過する細胞の検出・計数は、細胞を直接頭微鏡で捉えることにより行うこともできるが、常法に従い、予め細胞を発光・蛍光物質でマーキングしておき、その発光・蛍光を捕捉することにより容易に検出・計数することができる。

(12)

21

## 【0081】

【発明の効果】本発明の構造によれば、ウェルに液体試料を注入する際に試料が他のウェルに移動し、或いは溢れ出ることを防止することができ、また、注入された試料のウェル内における位置を調整し、或いは、次のウェルに試料を制御しながら移動させることができる。

【0082】本発明の構造は、溶液や懸濁液等の、微細の試料を取扱う場合に適用する場合、或いは、細胞や粒子を大きさにより分離する場合に、特に技術的効果が高いものであり、広く応用が可能である。

【0083】本発明の構造を、細胞走化性検出装置又は細胞の走化性を利用する細胞分離装置に応用するとき、高い技術的効果が得られる。即ち、細胞や液体溶渣等の試料を注入・吸引する際の圧力変化による試料の不測の移動を抑制することができ、更には、装置の水平が崩れた時でも試料の不測の移動を抑制し、細胞の自力による運動を正確に捉え、或いは、所望の細胞を取出すことができる。即ち、走化性因子又は阻害剤の作用と細胞の性質を忠実に反映させた結果を得ることができる。

【0084】本発明に関わる細胞走化性検出装置又は細胞の走化性を利用する細胞分離装置の構造において、ウェルとウェルの間に存在する流路に土手を設けること、或いは土手に所定の溝を構成する隔壁を設けること又は土手の上面に形成された平面がガラス基板との間で所定の隙間を形成することにより、一方のウェル細胞懸濁液を入れ、他方のウェルの側から適量の液体を吸引するとき、細胞が流路の近傍に集まり、細胞の進行方向に向かって並ぶという状態が容易に作り出される。その結果、細胞の走化性有無がより正確に検出できる。

【0085】本発明の構造によれば、装置の小型化を図ることができ、細胞走化性検出又は走化細胞分離装置に適用すれば、使用する細胞の量を、従来使用されてきたポイタンチャンバーに比べ、50分の1乃至1000分の1とすることが可能である。即ち、本発明の装置においては、試料として全血のような生体試料そのものを用いることができ、かくして全血を試料としたとき、好中球の走化性を検出する場合は $0.1\mu\text{m}$ の血液でよく、好酸球、単球又は好塩基球では $1\mu\text{m}$ 程度の血液で測定可能である。

【0086】本発明の構造によれば、液体の注入に際し、微妙な調整を要しないところから装置の自動化が容易に行えるというメリットがある。

【0087】本発明に関わる装置の単位ユニットは微小なものとすることができますため、多数のユニットを集積させることができますので、多數検体の同時処理が可能な装置を組み立てることができる。また、その場合、液体の注入及び検出が自動化された装置とすることが容易である。

【0088】多數のユニットを集積させるに当たり、異なるタイプのユニットを組み合わせて集積させること

特開2003-88357

22

により、目的を異にする検出・分離を同時にを行うことができ、処理の効率を上げることが可能となる。例えば、細胞走化性検出装置の場合、同一種の細胞に対して複数の走化性因子またはその阻害剤の検索を行うとき、或いは、同一の走化性因子について異なる細胞の走化性を調べるとき等においてその検索を一度に行うことが可能となる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明者らが先に提案した、細胞走化性検出及び細胞分離のための装置の一例を示す概念図。

【図2】図1の装置の下面図。

【図3】本発明の構造を、細胞走化性検出及び細胞分離装置に適用した場合の一例を示す概念図。矢印は、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

【図4】本発明の構造を、細胞走化性検出及び細胞分離装置に適用した場合の他の例であって、ウェルに試料を注入・採取するための管3と試料の注入・採取時における昇圧・減圧を回遊するための管4が設けられている装置の構造を示す概念図。矢印は、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

【図5】本発明の構造を、細胞走化性検出及び細胞分離装置に適用した場合の他の例であって、細胞を入れるウェル2Aの管3Aの上端部3Ahが、他のウェル2Bの管3Bの上端部3Bbより高く設定されている構造を示す概念図。矢印I及び矢印IIは、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

【図6】本発明の構造を、細胞走化性検出及び細胞分離装置に適用した場合の他の例であって、ウェルに試料を注入・採取するための管3と試料の注入・採取時における昇圧・減圧を回遊するための管4が設けられている装置において、細胞を入れるウェル2Aの管3A、4Aの上端部3Ah、4Ahが他のウェル2Bの管3B、4Bの上端部3Bb、4Bbよりも高く設定されている構造を示す概念図。矢印I及び矢印IIは、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

【図7】図6の構造の変形例を示す。矢印I及び矢印IIは、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

【図8】ウェルが流路を介して3通りに連通する場合の基板の上面図を示す。

【図9】複数のウェル2B<sub>1</sub>～2B<sub>n</sub>が流路1を介して1つのウェル2Aに連通している場合の基板の上面図を示す。

【図10】図9の基板を備えた装置であって、図9の一点破線における断面図を示す。矢印I及び矢印IIは、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

【図11】図9の連通様式が円形に構成された場合の上面図を示す。

【図12】流路1の構造の一例を示す。

【図13】流路1における隔壁12と溝13の配列例を示す。矢印は、相対するウェルに向かう方向を示す。

【図14】図13の流路1の断面図を示す。

【図15】流路1を挟んで相対するウェルに向かう方向の

50

(13)

23

溝13が、これに直交する2本の溝14で連通している場合を示す。矢印は、相対するウェルに向かう方向を示す。

【図16】多数ユニットの集積例であり、同一タイプのユニットの集積例を示す。

【図17】複数種のユニットを多数集積させた例を示す説明図である。

【図18】多数のユニットを円形に集積させた例を示す。

【図19】図18の一点破線における断面図である。

【図20】細胞走化性検出及び細胞分能装置の組立例を示す図であり、(1)は部品毎の斜視図、(2)は対応する断面図である。

【図21】反応させるウェルと目的物を収納するウェルとがカラムを介して連通している装置の概念図である。矢印I及び矢印IIは、装置を構成する液体の液面の位置を示す。

【図22】物質を分離する装置の概念図。矢印I及び矢印IIは、装置を構成する液体の液面の位置を示す。

【図23】流路1における土手8が多段式のテラス11～18を有する場合を示す。

【図24】流路に沿って壁が設けられたウェルの例を示す図である。

【図25】流路に沿って壁が設けられたウェルの例を示す図である。

【図26】図24のウェルが集積配置された例を示す図である。

【図27】本発明に関わる装置の自動判別機構の例を示す図である。

【図28】液面調節ビベットの動きを示す図である。

【図29】細胞貯蔵部における容器の例を示す図である。

【図30】換体貯蔵部における容器の例を示す図である。

【図31】換体貯蔵部における図30の容器の配置例を示す図である。

【図32】換体貯蔵部における容器の例を示す図である。

【図33】換体貯蔵部における図32の容器の配置例を示す図である。

【図34】本発明で使用されるビベットの例を示す図である。

【図35】試料注入・採取用管の上部にビベット先端部の導入口を設けた例を示す。

【図36】流路を兼ねて相対するウェルに向かう方向の溝が、これに直交する2本の溝で連通していると共に、相対するウェルに向かう方向の溝の幅が直交する溝を構切るごとに段階的に変化する場合を示す。図中矢印は相対するウェルに向かう方向を示す。図は、隔壁自体の幅が変化する場合を示す。

【図37】図36の変形例で、隔壁の大きさは同じであるが、その数が増減する場合を示す。図中矢印は相対するウェルに向かう方向を示す。

【図38】流路を兼ねて相対するウェルに向かう方向の溝

特開2003-88357

24

が、これに直交する3本の溝で連通していると共に、相対するウェルに向かう方向の溝が、これに直交する溝を構切ることに相互の位置関係を変えている場合を示す。図では、2分の1ピッチ、直行する方向にシフトしている場合を示す。図中矢印は相対するウェルに向かう方向を示す。

【図39】隔壁が相対するウェルに向かう方向に繋がっている場合を示す。図中矢印は相対するウェルに向かう方向を示す。

10 【図40】土手の中央にテラスを設け、テラスをはさんで隔壁の列を2箇所に形成した例を示す。

【符号の説明】

1：流路

2：ウェル。添字のA、B、B<sub>1</sub>～、Cはウェルの区別を意味する。

3：試料注入・採取用管。添字のA、B、B<sub>1</sub>～、Cはウェルの区別を、aは管3に対応する基板5の貫通孔を、bは管3の上端部を夫々意味する。

4：試料の注入・採取時における昇圧・減圧を回復するための管。添字のA、B、B<sub>1</sub>～、Cはウェルの区別を、aは管4に対応する基板5の貫通孔を、bは管4の上端部を夫々意味する。

5：基板

5'：パッキング

6：ガラス基板

7：管を穿ったブロック

8：土手

9：検出器

10：管の上端部により共有される空間

30 11、11'～：テラス

12：流路1における隔壁

13：流路を兼ねて相対するウェルに向かう方向の溝

14：溝13に直交する溝

15：マグネット

16：ウェルの間に存在するカラム

17：カバーキャップ

18：O-リング

19：ガイドピン受孔

20：ガイドピン

40 21：中间支持体

22：底支持体

23：底部基板

24：流路に沿って設けられた壁

25：細胞貯蔵容器

26：細胞注入部

27：液体導入部

28：換体貯蔵容器

29：ビベット先端部の導入口

30：ビベット先端部

50 31：マルチチャネルシリング

(14)

特開2003-88357

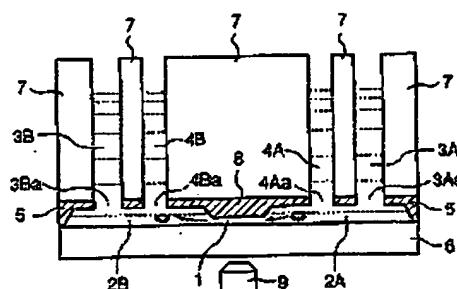
25

26

32：アクチュエーター  
 33：自動ピペットのニードル  
 34：マニュアル操作用ピペットの先端部  
 ←：装置を満たす液体の液面の位置  
 →：上位にある管の上端部が覆われる液面の位置

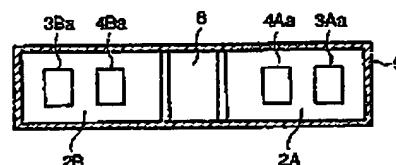
\*←II：上位にある管の上端部が露出する液面の位置  
 X-X'：銃体供給ピペットの筋線  
 Y-Y'：細胞供給ピペットの筋線  
 Z-Z'：液面調節ピペットの筋線  
 \*

【図1】



1: 捕獲  
 2: ウニール  
 3: 試料注入・採取用管  
 4: 試料の注入・採取時ににおける  
 异圧・加圧を回復するための管  
 5: 基板  
 6: ガラス基板  
 7: 管を保つたブロック  
 8: 土手  
 9: 採出器

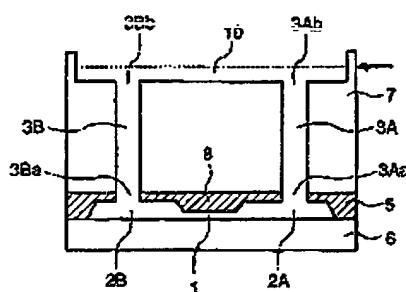
【図2】



【図14】

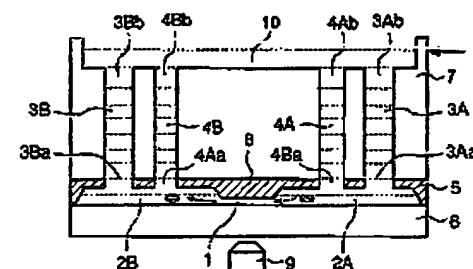


【図3】

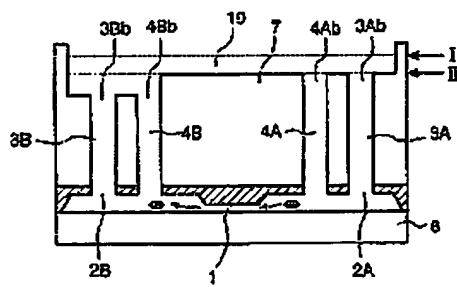


10: 管の上端部により占有される空間  
 ←：装置を満たす以外の液面の位置

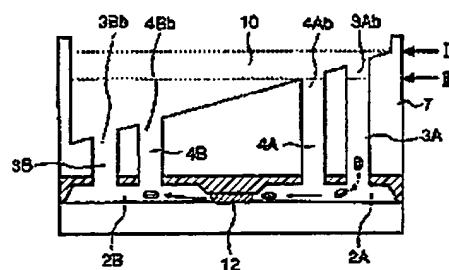
【図4】



【図6】



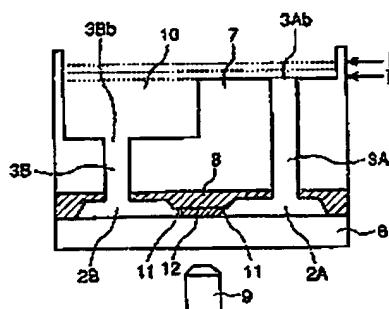
【図7】



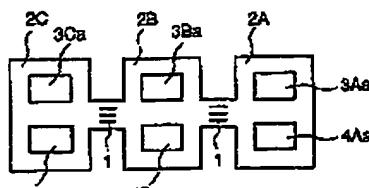
(15)

特開2003-88357

【図5】

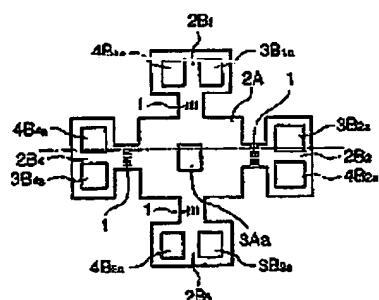


【図8】

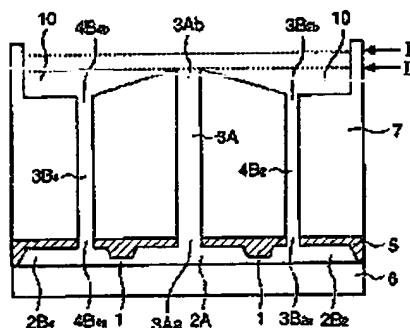


II: ナラス  
I: 電路 1 における障壁  
—I: 上位にある層の上端部が覆われる被覆の位置  
—II: 上位にある層の上端部が露出する被覆の位置

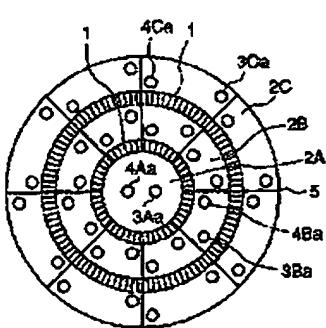
【図9】



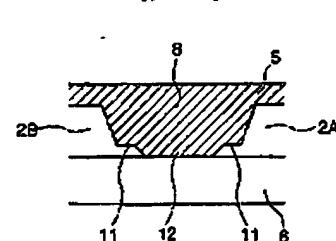
【図10】



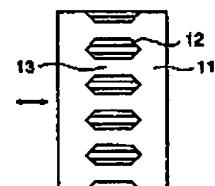
【図11】



【図12】



【図13】

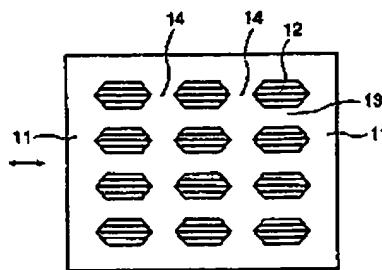


13: 沿路を挟んで相対するウエルに向かう方向の導

(15)

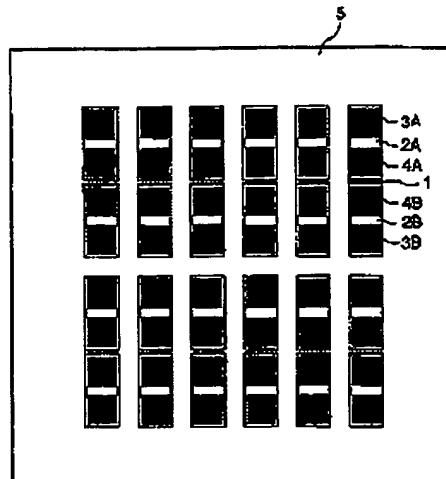
特開2003-88357

【図15】

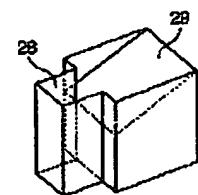


14: 第13に遮光する構

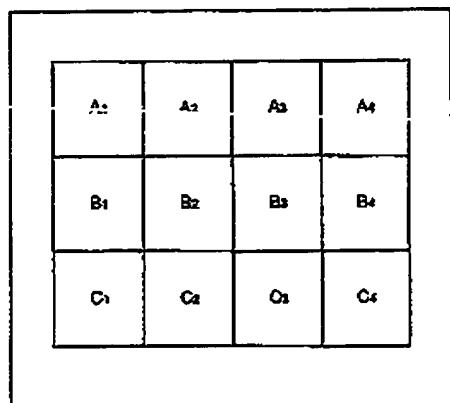
【図16】



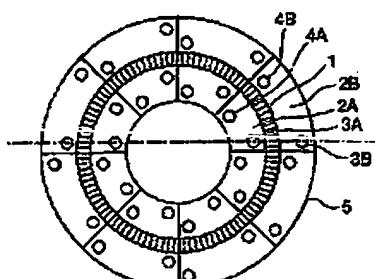
【図32】



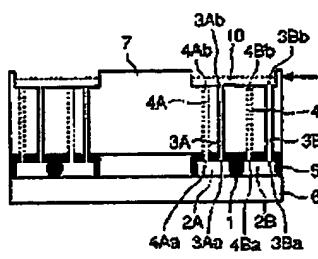
【図17】



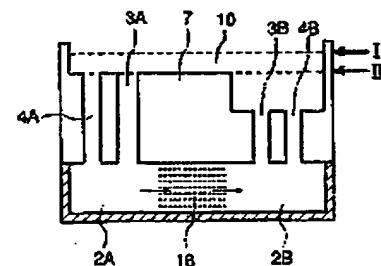
【図18】



【図19】



【図21】

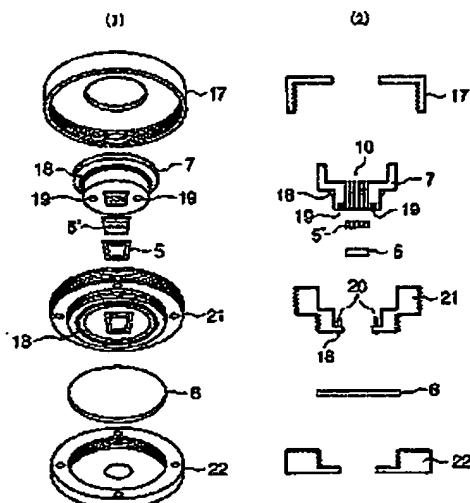


16: ウエルの間に存在するカム

(17)

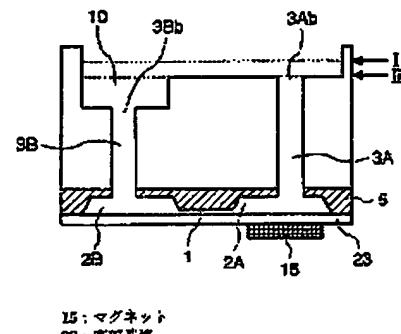
特開2003-88357

[圖20]



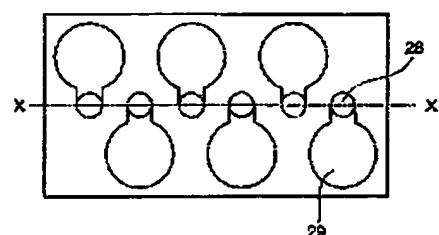
3': パッキング  
 17: カバー・キャップ  
 18: O-リング  
 19: ガイドピン受皿  
 20: ガイドピン  
 21: 宇高支持部  
 22: 底支持体

[図22]

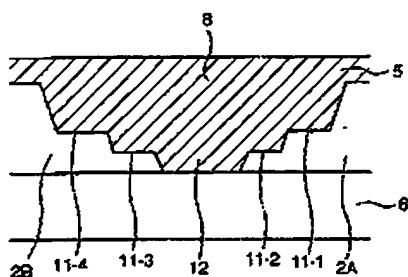


15 : マグネット  
23 : 広野嘉次

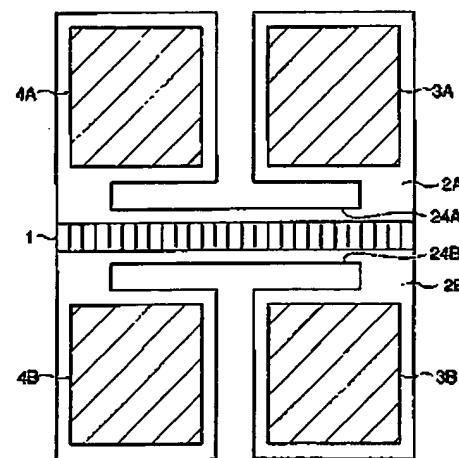
[图31]



[图23]



[図24]

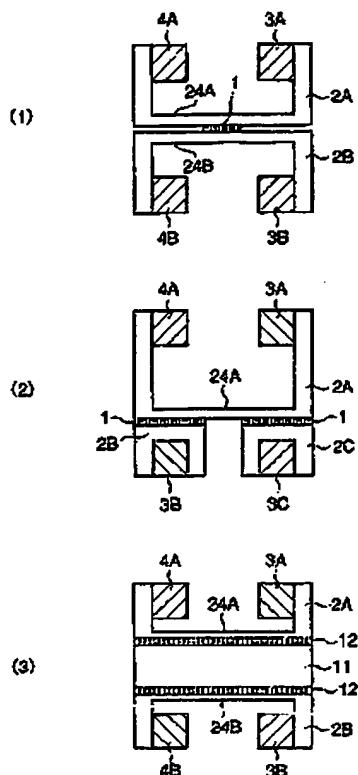


#### 24：運路に沿って設けられた駅

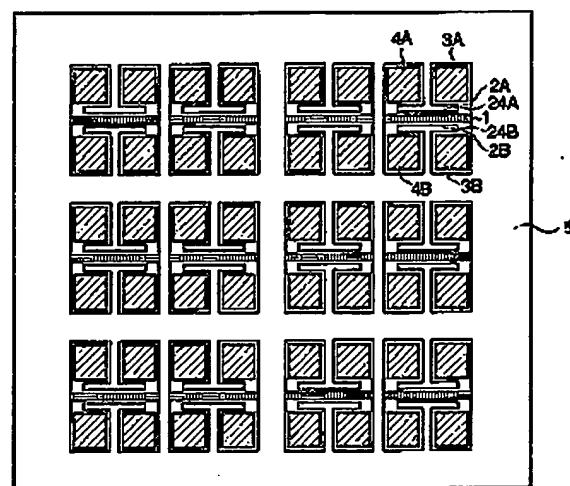
(18)

特開2003-88357

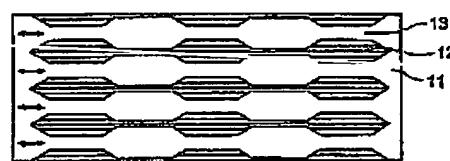
[図25]



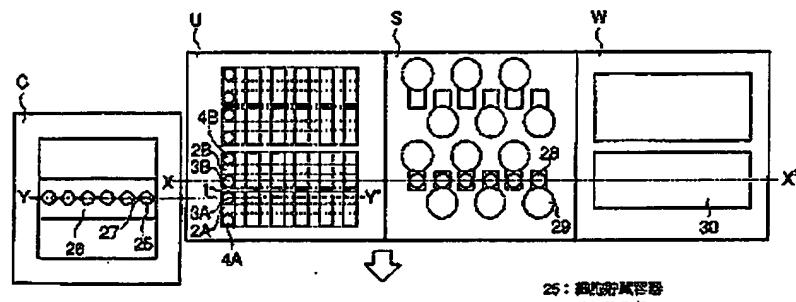
[図26]



[図29]



[図27]

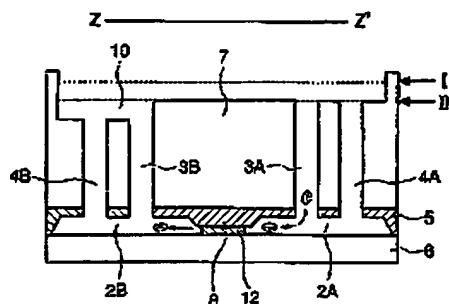


25: 滤液供給管路  
26: 滤液注入部  
27: 液体導入口  
28: 檢査対象容器  
29: ピペット先端部の導入口  
30: ピペット洗浄部  
X-X': 濃縮液供給ピペットの軌跡  
Y-Y': 濃縮液供給ピペットの軌跡

(19)

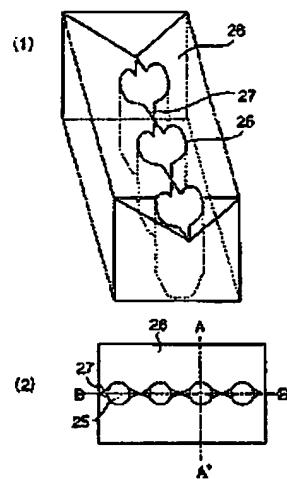
特開2003-88357

【図28】

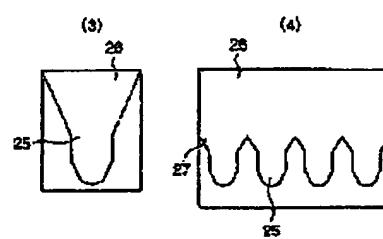
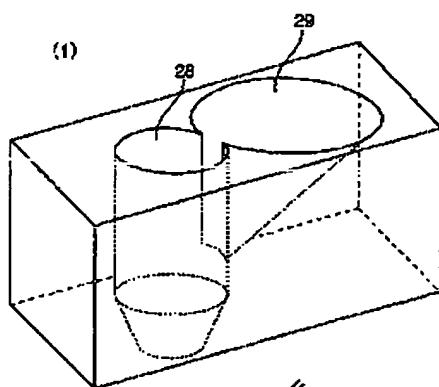


Z-Z'：液面測定ピベットの断面

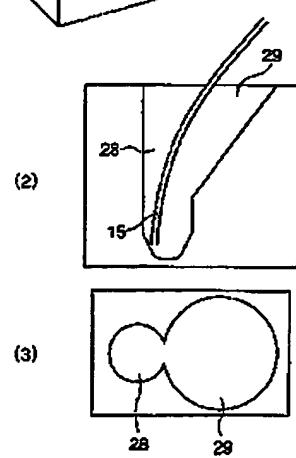
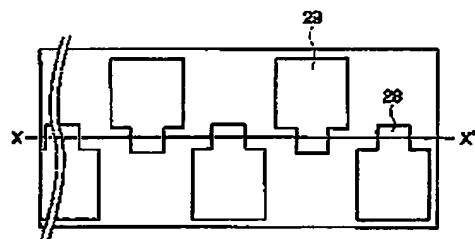
【図29】



【図30】



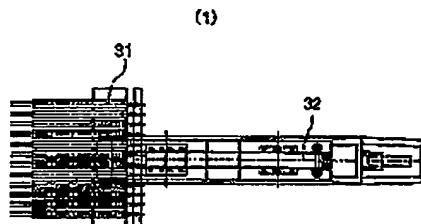
【図33】



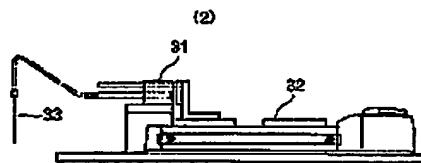
(20)

特開2003-88357

【図34】

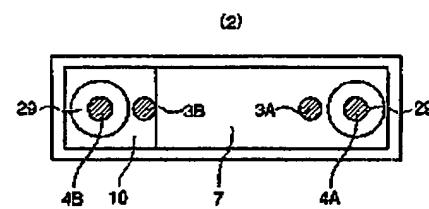
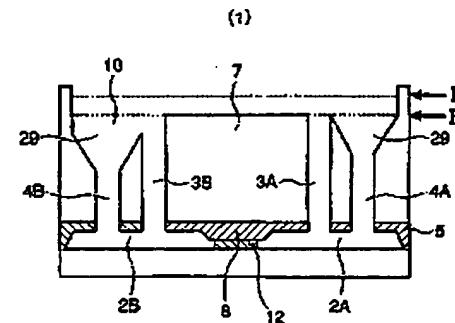


31: マルチチャネルシリンジ  
32: アクチュエーター

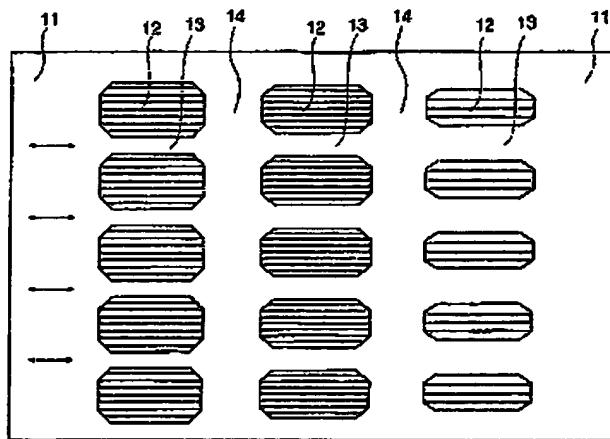


33: 自動ピペットのニードル

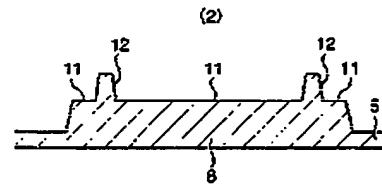
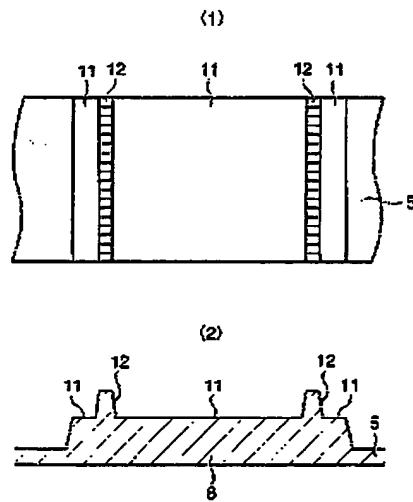
【図35】



【図36】



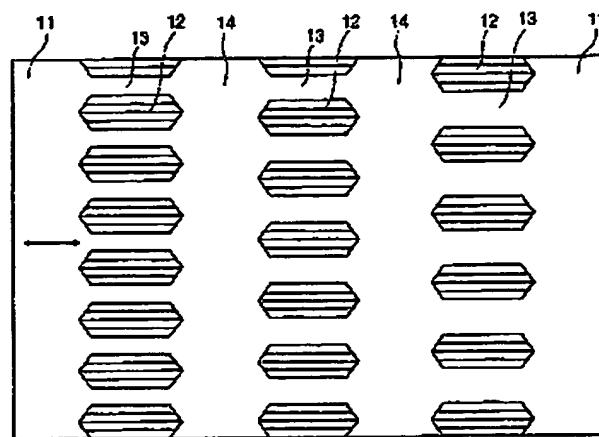
【図40】



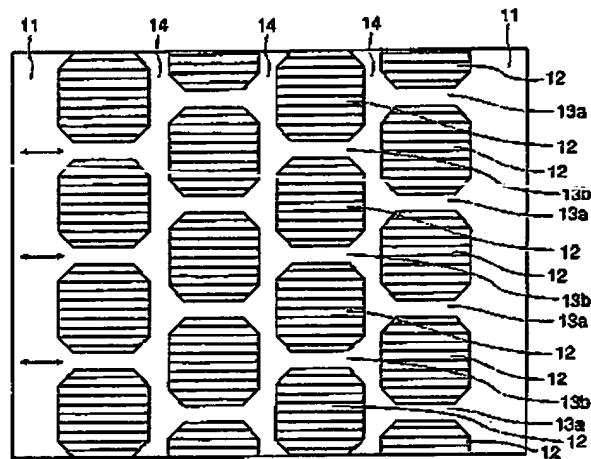
(21)

特開2003-88357

[図37]



[図38]



フロントページの続き

(72)発明者 菊池 深子  
北海道小樽市桂岡町14番30

F ターム(参考) 2G045 AA24 CB01 FA16 GC22  
2G58 AA09 BA07 DA07 EA11 GA01  
4B029 AA08 AA09 BB01 CC01 GA03  
GB04 GB06 HA05 HA09

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.